

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
(Direktor: Professor Dr. med. R. Sievert)

Serologische Untersuchungen über die Antigenstruktur von *Candida Krusei*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Heinke Dupont, geb. Feller
aus Frankfurt am Main

Marburg 1967

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus dem Hygiene-Institut der Universität Marburg an der Lahn
(Direktor: Professor Dr. med. R. Sievert)

Serologische Untersuchungen über die Antigenstruktur von Candida Krusei

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Heinke Dupont, geb. Feller

aus Frankfurt am Main

Marburg 1967

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am: 2. 2.1967

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Professor Dr.med., Dr.med.dent. H. Heuser

Referent: Professor Dr. med. R. Siegert

Correferent: Dozent Dr. med. W. Bommer

MEINEN ELTERN IN DANKBARKEIT

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
A. <u>Einleitung</u>	1
B. <u>Methodik</u>	3
I. Züchtung der Hefezellen	3
II. Antigenbereitung und Gewinnung von Immunseren	3
III. Die Komplementbindungsreaktion	4
IV. Agar- und Immunoелеktrophorese	4
V. Absorption	6
C. <u>Ergebnisse</u>	7
I. Die Komplementbindungsreaktion	7
1. Homologe Antigene	7
2. Heterologe Antigene	7
3. Durch die Phenol-Wasser-Extraktion gewonnene Antigene	7
4. Kreuzreaktionen mit <i>Candida albicans</i> und <i>Candida tropicalis</i>	8
II. Absorptionsversuche	8
III. Agarelektrophorese	13
1. Nicht erhitzte Antigene	13
2. Erhitzte Antigene	13
3. Wässrige Phasen	15
4. Prüfung des Überstandes von drei Hefen	15
IV. Immunoелеktrophorese	15
1. Homologe Reaktionen	15
2. Heterologe Reaktionen	17
3. Auf 60°C und 100°C erhitzte Antigene	18
4. Wässrige Phasen	20
5. Immunoелеktrophorese mit <i>Candida albicans</i> und <i>Candida tropicalis</i>	21
6. Immunoелеktrophorese mit absorbierten Seren	21
7. Immunoелеktrophorese mit den Kochrückstän- den aus <i>Candida Krusei</i> und <i>Candida albicans</i>	22
D. <u>Besprechung</u>	24
E. <u>Zusammenfassung</u>	28
F. <u>Literatur</u>	29

A. Einleitung

Während man früher unter den Sproßpilzen nur *Candida albicans* und *Candida tropicalis* als pathogen ansah, wurde in den beiden letzten Jahrzehnten bekannt, daß auch andere *Candida*-arten fakultativ pathogen sein können. So fanden DROUHET und VIEU (1) unter 342 Hefestämmen, die sie bei Mykosekranken isoliert hatten, in 78,7 % *C. albicans*, in 7,6 % *C. tropicalis* und in 7,7 % *C. Krusei*. In folgenden Untersuchungsmaterialien konnte DROUHET *C.-Krusei*-Keime nachweisen: Sputum, Urin, Abszesseiter, Haut, Nägel sowie Epithel der Mundhöhle, des Intestinaltraktes und der Vagina. Als Haut- und Schleimhautsaprophyt ist *C. Krusei* meist nur fakultativ pathogen. Ernstere Manifestationen wurden hauptsächlich bei Scheidenmykosen und subkutanen Abszessen beobachtet. Eine Reihe anderer Autoren beschreibt ebenfalls lokalisierte und generalisierte Mykosen durch *C. Krusei*, und viele sehen diesen Sproßpilz als häufigsten Krankheitserreger nach *C. albicans* und *C. tropicalis* an (JONES und CARTER (2), BENHAM (3), KLIGMAN und DELAMATER (4), FISCHER (5), STAIB und S. ATA (6), SCHABINSKI (7), POLEMANN (8) und MIZUNO (9)).

Um die Artdiagnose zu vereinfachen und zu beschleunigen, versuchte man in den letzten Jahren in zunehmendem Maße, eine serologische Differenzierung einzuführen, vor allem STONE und GARROD (10), ALMON und STOVALL (11), MARTIN (12, 13), SALVIN (14), PECK (15), POSPISIL (16, 17), JONSEN (18), SEELIGER (19, 20) und TSUCHIYA (21, 22, 23). Bei den untersuchten *Candida*-arten handelte es sich meist um *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. pseudotropicalis*, *C. Krusei*, *C. parakrusei*, *C. Guilliermondii* und *C. stellatoidea*, die auf ihr Verhalten in der Komplementbindungs-, Präzipitations-, Agglutinations- oder Absorptionsreaktion geprüft wurden.

Die Antigenuntersuchungen von *C. Krusei* führten zu unterschiedlichen Ergebnissen. JONSEN (18) gibt aufgrund von Kreuzreaktionen zwischen den einzelnen Hefearten an, daß *C. Krusei* ein oder mehrere spezifische Antigene besitzt, die denen von *C. Mycoderma* sehr ähnlich sind. Nach TSUCHIYA (22) besitzt *C. Krusei*

drei thermostabile Antigene, die auch in *C. albicans* und *C. tropicalis* enthalten sind. Zusätzlich soll *C. Krusei* ein thermolabiles Antigen aufweisen, das artspezifisch sein soll. POLEMANN (8) fand keine Antigengemeinschaft zwischen *C. Krusei* und *C. albicans* oder *C. tropicalis*. POSPISIL (17) bestätigte jedoch weitgehend die Ergebnisse von TSUCHIYA. BIGUET (14, 15) wies mit Hilfe der Immunoelktrophorese 11 Antigenfraktionen bei *C. Krusei* nach, von denen 2 Fraktionen Kreuzreaktionen mit *C. albicans* zeigen.

Die Untersuchungen von SIEGERT, MÜLLER, PACHALY, HIRSCH (26, 27) an *C. albicans* und *C. tropicalis* haben gezeigt, daß bei Verwendung von nur einem serologischen Untersuchungsverfahren Fehldeutungen möglich sind. Deshalb ist anzunehmen, daß die Diskrepanz zwischen den Untersuchungsergebnissen verschiedener Autoren darauf beruht, daß sie unterschiedliche Reaktionen verwendeten. Es soll daher in dieser Arbeit der Antigenaufbau von *C. Krusei* mit Hilfe mehrerer serologischer Methoden, nämlich der Komplementbindungsreaktion, Absorption, Agar- und Immunoelktrophorese untersucht werden. Als Antigene dienten dabei nicht die intakten Hefezellen, mit denen bisher die meisten Untersuchungen durchgeführt wurden, sondern das Zellhomogenisat sowie die davon abgetrennten Zellwände und der Zellinhalt.

B. Methodik

=====

I. Züchtung der Hefezellen:

Verwendete Stämme:

Candida Krusei CBS 573 BERKHOUT,

Candida albicans CBS 256 (ROBIN) BERKHOUT und

Candida tropicalis CBS 94 (CASTELLANI) BERKHOUT.

Die Hefestämme stammten aus dem Centraal Bureau voor Schimmelculturs Delft und lagen in der Glattdform vor. Sie wurden von einer Vorkultur auf Rouxschalen mit Maltoseagar übertragen. Nach einer Bebrütung von 48 Stunden bei 30 ° C wurde der Pilzrasen mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt und zentrifugiert. Das Sediment wurde dreimal ausgewaschen, um alle Agarreste zu beseitigen.

II. Antigenbereitung und Gewinnung von Immunseren:

Das zur Immunisierung verwandte Zellmaterial wurde in der Kugelmühle (Firma Braun, Melsungen) 3 1/2 Min. bei 4000 UpM homogenisiert. Dabei war der Tubus je zur Hälfte mit Hefezellen und Glasperlen (Durchmesser 0,5 mm) gefüllt. Ein Teil des Homogenisates diente als Vollantigen, während der Rest durch Zentrifugieren bei ca. 3000 UpM in Zellinhalt (Überstand) und Zellwände (Sediment) getrennt wurde. Sowohl der Inhalt als auch die Zellwände wurden mikroskopisch auf ihre Reinheit geprüft. Jeweils die Hälfte dieser drei Antigen-suspensionen wurde im Wasserbad auf 100 ° C eine Stunde lang erhitzt. Mit den so erhaltenen 6 Antigensuspensionen wurden je zwei Kaninchen intravenös immunisiert. Nach vorheriger Serumkontrolle erhielten sie am ersten Tag 0,5 ml, am zweiten Tag 1,0 ml, am dritten Tag 1,5 ml und am vierten und fünften Tag je 2,0 ml Antigen. Darauf folgten noch 6 Injektionen von je 2,0 ml im Abstand von jeweils zwei Tagen (Gesamtmenge 19,0 ml). Vier bis fünf Tage nach der letzten Antigengabe wurde eine Probepunktion vorgenommen. Zeigte sich nur geringe Antikörperbildung, so wurde die Immunisierung fortgesetzt (bis zu 20 zusätzlichen Antigengaben).

Bei ausreichendem Antikörpertiter erfolgte die Blutentnahme aus der Ohrarterie. Das vom Blutkuchen getrennte Serum wurde 30 Min. lang bei 56 ° C inaktiviert und dann im Kühlschrank aufbewahrt bzw. eingefroren.

III. Die Komplementbindungsreaktion:

1. Antigene: Als Antigene dienten die gleichen Zellsuspensionen wie zur Immunisierung. Außerdem wurde mit dem Zellinhalt und den Zellwänden eine Phenol-Wasser-Extraktion nach WESTPHAL (28) durchgeführt, um die drei dabei entstehenden Phasen (wässrige Phase, Phenolphase und unlöslicher Rückstand) ebenfalls auf ihre Antigeneigenschaft zu prüfen.
2. Durchführung: Die Einstellung der Antigengebrauchsverdünnung erfolgte an Kontrollseren mit bekanntem Titer. Danach blieben die Röhrchen mit jeweils gleichen Anteilen von Serumverdünnung, Antigen und Komplement in der Wärmebindung bei 37 ° C eine Stunde im Wasserbad. 10 bis 20 Min. nach Zugabe des hämolytischen Systems war das Ergebnis abzulesen. Als positiv galt eine mindestens 50%ige Hämolysehemmung.

IV. Agar- und Immunelektrophorese:

1. Antigenbereitung: Für die Agar- und Immunelektrophorese wurden die Antigene in gleicher Weise aufbereitet wie zur Immunisierung. Da sich bei den Versuchen herausstellte, daß sich NaCl ungünstig auf die elektrophoretische Auftrennung der Antigene auswirkt, wurde Aqua dest. verwendet. Außerdem war eine starke Konzentrierung der Antigene nötig. Von dem Zellhomogenisat und den Zellwänden wurde eine ca. 50%ige Zellsuspension hergestellt. Der Zellinhalt wurde mit Carbowachs auf etwa ein Zehntel der durch Auswaschen verdünnten Ausgangsmenge eingeengt.
2. Antiseren: Wiesen die inaktivierten Kaninchenserum in der Komplementbindungsreaktion einen Serumtiter von 1 : 80 auf, so wurde eine Konzentrierung vorgenommen. Ein Teil der Seren wurde lyophilisiert und danach in einem Viertel

der ursprünglichen Flüssigkeitsmenge in Aqua dest. wieder aufgelöst. Bei den meisten Seren erfolgte die Isolierung der Gammaglobuline nach der von SOBER und PETERSON (29) beschriebenen Methode. Zur Chromatographie diente eine DEAE-Cellulosesäule von 35 cm Länge und 2,5 cm Durchmesser. Die Auftrennung des Serums erfolgte bei pH 7,6, welches mit 0,01 M Phosphatpuffer nach SÖRENSEN eingestellt war. Alle Apparate stammten von der Firma LKB - Schweden. Die bei 280 μ im UV-Spektrometer registrierten Gammaglobuline wurden aufgefangen und nach dem Einengen mit Carbowachs und Dialysieren gegen Aqua dest. lyophilisiert. Für die Immunelektrophorese wurden 50 mg Trockensubstanz in 1,0 ml NaCl gelöst.

3. Durchführung: Die Apparatur für die Agar- und Immunelektrophorese sowie alle notwendigen Zusatzgeräte stammten ebenfalls von der Firma LKB - Schweden. Die Herstellung des Agargels erfolgte mit 1,2 g Difco Agar Special Noble, 50,0 ml Veronalpuffer (auf 2000 ml Aqua dest. 9,62 g Na-Barbital, 12,96 g Na-Acetate und 1 n HCl, bis der pH-Wert 8,2 eingestellt war) und 50 ml Aqua dest.. Nach Erhitzen im siedenden Wasserbad für ca. 15 Min. wurde der Agar auf Objektträger gegossen.
4. Agarelektrophorese: War der Agar auf den Objektträgern erstarrt, so wurden mit ca. 5 mm breiten Fließpapierstreifen kleine Rillen ausgehoben, und die Antigene eingebracht. Nach der elektrophoretischen Auftrennung, die 60 bzw. 90 Min. bei 250 Volt erfolgte, kamen die Objektträger für ca. 10 Stunden in ein Fixierbad (Methanol-Eisessig-Wasser 9 : 1 : 5).
5. Immunelektrophorese: Sie erfolgte nach der von SCHEIDEGGER (30) modifizierten Methode. Das Antigenmaterial wurde in ausgestanzte Löcher mit einer Kapillare gegeben und 1 Stunde bei 250 Volt in der Elektrophoresekammer aufgetrennt. Danach konnte das Kaninchenserum in die vorgestanzten Gräben zur Diffusion eingebracht werden. Zur völligen Entwicklung der Präzipitationslinien war, je nach Serumtiter, ein Verbleib der Präparate in einer feuchten Kammer für 12 - 36 Stunden erforderlich. Anschließend erfolgte das Auswaschen

der Objektträger in physiologischer Kochsalzlösung für etwa 10 Stunden, um nichtgebundene Eiweißreste zu entfernen.

6. Färben der Präparate: Für die an der Luft getrockneten Objektträger wurden zwei verschiedene Färbungen angewandt: 0,5%ige Amidoschwarzlösung (10 B Merck in Methanol-Eisessig 9 : 1) und PAS-Färbung.

Die Präparate der Immunoелеktrophorese wurden in Amidoschwarzlösung gefärbt.

V. Absorption:

Die Absättigungsversuche wurden in gleicher Weise durchgeführt, wie von TSUCHIYA und Mitarbeitern (22) angegeben. Ein Reaktionsgemisch aus 1 ml unverdünntem Immunsерum und 3 ml Sediment von ganzen Hefezellen, die 3 Stunden auf 100 ° C erhitzt worden waren, verblieb 3 Stunden im Wasserbad bei 37 ° C und danach über Nacht im Kühlschrank. Nachdem die Zellen durch Zentrifugieren entfernt waren, wurde das absorbierte Serum im Röhrchenagglutinationstest mit dem nicht absorbierten Serum verglichen. Als Antigene dienten frisch abgeschwemmte Hefezellen sowie drei Stunden auf 100 ° C erhitzte ganze Zellen, wie sie zur Absorption verwendet worden waren. Um weitere Aufschlüsse über die Beschaffenheit der C.-Krusei-Antigene zu erhalten, wurde das absorbierte Serum in der Immunoелеktrophorese geprüft.

C. Ergebnisse

=====

I. Die Komplementbindungsreaktion:

1. Homologe Antigene: Mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion sollte geklärt werden, ob die 6 Antigenfraktionen von C. Krusei mit ihren entsprechenden Antiseren reagieren. Es stellte sich heraus, daß alle Fraktionen serologisch aktiv waren, wenn auch in unterschiedlicher Stärke. Wie Tabelle 1 zeigt, lagen die höchsten Werte bei einer Serumverdünnung von 1 : 320. Sie wurden bei der Reaktion von nichterhitztem Vollantigen mit dem homologen Antiserum erzielt. Eine gleich hohe Titerstufe konnte mit den erhitzten Zellwänden gegen das homologe Serum erreicht werden. Die Reaktionen mit den beiden Inhaltsstoffen und den nichterhitzten Zellwänden waren erst bei höheren Serumkonzentrationen positiv.
2. Kreuzreaktionen der 6 Fraktionen: Wie aus der Tabelle 2 hervorgeht, reagierte jedes der Antiseren auch mit den anderen Krusei-Fraktionen, und zwar wurden bei Verwendung nicht erhitzter Antigene etwa gleiche Titer erreicht wie mit den homologen Antigenen. Eine Ausnahme machten die gegen den Zellinhalt gerichteten Seren. Hier war der Titer, wenn Zellwände als Antigen gebraucht wurden, niedriger als mit den übrigen Antigenen. Alle Immunseren, die gegen nicht erhitzte Antigene gerichtet waren, zeigten nur mit allgemeinen erhitzten Antigenen gegenüber den nicht erhitzten eine etwas schwächere Reaktion. Bei den Seren gegen erhitzte Antigene bestanden keine derartigen Differenzen.
3. Prüfung der nach Phenol-Wasser-Extraktion gewonnenen Fraktionen: Um einige Aufschlüsse über den Antigencharakter der einzelnen Fraktionen zu gewinnen, wurden weitere Reaktionen mit den bei der Phenol-Wasser-Extraktion gewonnenen Phasen durchgeführt. Die Prüfung der Phenolphase und des unlöslichen Rückstandes ergab selbst mit unverdünntem Antiserum einen negativen Reaktionsausfall.

Anders waren die Ergebnisse bei den wässrigen Phasen, die bis zu einer Serumverdünnung von 1 : 80 positiv ausfielen (siehe Tabelle 3). Signifikante Unterschiede waren weder zwischen Wärme- und Kältephasen, noch zwischen den Zellwand- und Inhaltsextrakten nachzuweisen.

4. Kreuzreaktionen zwischen *C. albicans* und *C. tropicalis*:
Weiter sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit Antigengemeinschaften zwischen *C. albicans* und *C. tropicalis* bestehen. Geprüft wurde mit den gleichen C.-Krusei-Antiseren wie bei den vorhergehenden Reaktionen. Als Antigene dienten die wässrigen Phasen der Hüllen und Inhaltsstoffe von *C. albicans* und *C. tropicalis*, und zwar jeweils aus der Wärme- und der Kälteextraktion. Es zeigte sich, daß nur eine sehr schwache Bindungskraft zwischen den Reaktionspartnern bestand. *C. albicans* und *C. tropicalis* reagierten jeweils etwa in gleicher Stärke mit den C.-Krusei-Antiseren. Auch bei dieser Komplementbindungsreaktion waren signifikante Unterschiede zwischen Zellwänden und Zellinhalt sowie zwischen Wärme- und Kältephasen nicht nachzuweisen. Bei den Untersuchungen mit Antiseren gegen *C. albicans* und *C. tropicalis* reagierten die C.-Krusei-Antigene nur sehr schwach bis zu einer Serumverdünnung von 1 : 10 (siehe Tabelle 4).

II. Absorptionsversuche:

Antiserum gegen das nicht erhitzte Homogenisat von *C. Krusei* wurde im Röhrchen-Agglutinationstest mit frischen, nicht erhitzten bzw. 3 Stunden auf 100 ° C erhitzten intakten Krusei-Zellen ausgetitriert. Mit beiden Zellsuspensionen wurde der Titer 1 : 32 erreicht. Nach Absorption des Serums mit erhitzten Zellen blieb eine Agglutination der erhitzten Zellsuspension aus. Mit nicht erhitzten Zellen ließ sich noch ein Agglutinationstiter von 1 : 16 nachweisen.

Tabelle 1
=====

Komplementbindungsreaktion zwischen 6 Antigenfraktionen
von C.Krusei mit ihren entsprechenden Antiseren

(mit jeder Fraktion wurden jeweils 2 Kaninchen immunisiert)

A n t i g e n		Antiserum-Titer	
		1. Tier	2. Tier
Homogenisat	nicht erhitzt	160	320
	erhitzt 100 ° C	80	80
Zellinhalt	nicht erhitzt	80	80
	erhitzt 100 ° C	80	80
Zellwände	nicht erhitzt	80	160
	erhitzt 100 ° C	320	160

Tabelle 2

=====

Kreuzreaktionen zwischen Homogenisat, Zellwand und Zellinhalt
von C. Krusei und deren Antiseren

Antiseren gegen:		Nr. des Tie- res	A n t i g e n e :							
			Zellinhalt		Zellwände		Homogenisat			Zell- in- halt 60°
			n.e.	100°	n.e.	100°	n.e.	100°	60°	
Zellinhalt	nicht erhitzt	193	80	40	20	10	80	40	20	40
		194	80	40	20	10	80	40	10	20
	erhitzt 100 ° C	195	80	80	40	40	40	40	40	160
		196	80	80	40	20	20	20	40	80
Zellwände	nicht erhitzt	199	80	80	80	20	160	80	80	160
		200	40	40	160	20	160	80	-	-
	erhitzt 100 ° C	201	160	160	160	320	320	160	160	160
		202	160	160	160	160	160	160	80	160
Homogenisat	nicht erhitzt	148	160	80	160	160	160	80	80	80
		149	80	40	80	160	320	80	80	80
	erhitzt 100 ° C	146	40	80	40	40	80	80	40	80
		147	40	80	40	20	40	80	40	160

Tabelle 3
=====

Komplementbindungsreaktion zwischen 6 Antiseren gegen
C.Krusei und den wässrigen Phasen
der Phenol-Wasser-Extraktion von C.Krusei

Antigen:	Titer der Antiseren gegen:					
	Inhalt		Zellwände		Homogenisat	
	nicht erh.	100° erh.	nicht erh.	100° erh.	nicht erh.	100° erh.
a K	10	10	40	80	80	20
b K	20	10	20	40	20	10
a W	10	10	40	80	80	20
b W	20	10	20	40	20	10

Erklärung:

a = Inhalt, wässrige Phase
b = Zellwände, wässrige Phase
K = Kälteextraktion
W = Wärmeextraktion

Tabelle 4

=====

Komplementbindungsreaktion der Zellwandantiseren von
C. albicans, C. tropicalis und C. Krusei mit den
wässrigen Phasen der Phenol-Wasser-Wärme-Extraktion

Antigene		Titer der Antiseren gegen:					
		C.albicans		C.tropicalis		C.Krusei	
		Zellwände		Zellwände		Zellwände	
		nicht er- hitzt	auf 100° er- hitzt	nicht er- hitzt	auf 100° er- hitzt	nicht er- hitzt	auf 100° er- hitzt
C.Krusei	a	10	10	10	0	40	80
	b	10	10	10	5	20	40
C.albicans	a	80	80	80	40	5	20
	b	320	160	160	80	10	20
C.tropicalis	a	80	40	40	40	10	5
	b	160	80	80	80	5	5

Erklärung:

a = Inhalt, wässrige Phase

b = Zellwände, wässrige Phase

III. Agarelektrophorese:

1. Nicht erhitzte Antigene: Bei den Untersuchungen von MÜLLER und HIRSCH (27) an *C. albicans* und *C. tropicalis* ließen sich zwei unterschiedliche Substanzgruppen nachweisen. Es wurde deshalb die Agarelektrophorese auch mit den verschiedenen Antigenaufbereitungen von *C. Krusei* durchgeführt. Sie führte bei dem nicht erhitzten Homogenisat und dem Zellinhalt ebenfalls zu einer Auftrennung in zwei Substanzgruppen. Die zur Anode gewanderten Stoffe ließen sich mit Amidoschwarz anfärben, während die zur Kathode gewanderten erst nach der PAS-Färbung zur Darstellung kamen. Wie die Abbildung 1 zeigt, läßt sich jede dieser beiden Gruppen in drei Fraktionen auf trennen. Die nicht erhitzten Zellwände zeigten keine Wanderung.



Abb. 1: Agarelektrophorese von *C. Krusei*:

oben: Inhalt, nicht erhitzt, Amidoschwarz.

unten: Homogenisat, erhitzt, PAS-Färbung.

2. Erhitzte Antigene: Zunächst wurden die auf 100 ° C erhitzten Antigene geprüft. Dabei konnten zur Anode wandernde Substanzgruppen nicht nachgewiesen werden, während die kathodenwärts gewanderten deutlich sichtbar waren. Bei dem Homogenisat und dem Zellinhalt ließen sich 3 Fraktionen unterscheiden. Die erhitzten Zellwände

zeigten zwar auch eine deutliche Wanderung, aber keine Auftrennung (siehe Abbildungen 2 und 3). Wurden die Antigene nur auf 60°C erhitzt, so blieben die zur Anode wandernden Substanzen zwar erhalten, verloren aber ihre Trennfähigkeit. Die zum Minuspol wandernden Stoffgruppen ließen die gleichen Fraktionen erkennen wie das auf 100°C erhitzte Material. Die auf 60°C erhitzten Zellwände verhielten sich ebenfalls wie die auf 100°C erhitzten.



Abb. 2: Agarelektrophorese von C. Krusei:
Zellwände, auf 100°C erhitzt, PAS-Färbung.



Abb. 3: Agarelektrophorese von C. Krusei:
Inhalt, wässrige Phase, Wärmeextraktion,
PAS-Färbung.

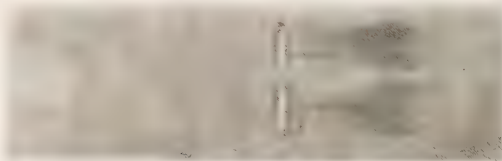


Abb. 4: Agarelektrophorese von C. Krusei:
oben: Zellwände, wässrige Phase, Wärmeextraktion, PAS-Färbg.
unten: Zellwände, wässrige Phase, Kälteextraktion, PAS-Färbg.

3. Wässrige Phasen: Ferner sollte untersucht werden, wie sich die einzelnen Antigene nach der Phenol-Wasser-Extraktion verhalten. Zwischen den in der Wärme und in der Kälte extrahierten Antigenen ergaben sich keine qualitativen Unterschiede. Die nach der Kälteextraktion gewonnenen Inhaltsstoffe ließen sich allerdings nur sehr schwach darstellen. Die wässrigen Phasen des Zellinhalts ergaben ein ziemlich homogenes Bild und zeigten keine deutliche Auftrennung. Es besteht eine weitgehende Übereinstimmung zwischen den zur Kathode gewanderten Substanzgruppen des nicht behandelten Inhaltes und des Homogenisates. Die wässrigen Phasen der Zellwände enthalten einen stark ausgeprägten, kathodenwärts wandernden Antigenanteil.
4. Prüfung des Überstandes von drei Hefen: Bei den Absorptionsversuchen war die Frage aufgetreten, ob bei dreistündigem Erhitzen der Hefezellen serologisch aktive Substanzen in die umgebende Flüssigkeit übergehen. Aus diesem Grunde wurde der nach dem Erhitzen gewonnene und in Alkohol gefällte Überstand zunächst in der Agar- und dann in der Immunelektrophorese geprüft. Neben dem Überstand von *C. Krusei* wurden noch die Überstände von *C. albicans* und *C. pseudotropicalis* verwendet. Bei *C. albicans* und *C. Krusei* traten übereinstimmende, zum Minuspol wandernde Substanzen auf, die sehr scharf in 2 Fraktionen getrennt und in sich noch unterteilt waren. Die bei *C. pseudotropicalis* kathodenwärts wandernden Stoffe ließen nur zwei wesentlich schwächere Anteile erkennen (siehe Abbildungen 5 und 6).

IV. Immunelektrophorese:

Um weiteren Aufschluß über die Antigenstruktur von *C. Krusei* zu erhalten, wurden das Homogenisat sowie der davon getrennte Zellinhalt und die Zellwände mit Hilfe der Immunelektrophorese geprüft.

1. Homologe Reaktionen: Das Homogenisat bildete nach der elektrischen Wanderung mit dem entsprechenden Antiserum mindestens 7 Präzipitationslinien, von denen 3 auf der



Abb. 5: Agarelektrophorese:

oben: Kochextrakt von *C. Krusei*.

unten: Kochextrakt von *C. albicans*.



Abb. 6: Agarelektrophorese:

Kochextrakt von *C. pseudotropicalis*.

Anodenseite, zwei um den Auftragspunkt und 2 bis 3 auf der Kathodenseite gelegen waren (Abbildung 7). Das gleiche Bild ergab das nicht erhitzte Inhaltantigen mit seinem Antiserum. Wie nach der Agarelektrophorese zu erwarten war, zeigten die nicht erhitzten Zellwände keine Wanderung und bildeten somit auch nur eine Präzipitationslinie um den Auftragspunkt. Bei den erhitzten Zellwänden war dagegen mindestens eine deutliche, zur Kathode gerichtete Linie sichtbar (Abbildungen 8 und 9).



Abb. 7: Immunelektrophorese von C. Krusei:
Homogenisat gegen Homogenisat-Antiserum.

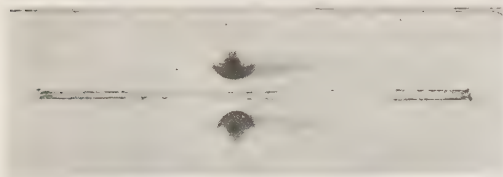


Abb. 8: Immunelektrophorese von C. Krusei:
Homologe Reaktionen mit nicht erhitzten Zellwänden.



Abb. 9: Immunelektrophorese von C. Krusei:
Homologe Reaktionen mit erhitzten Zellwänden.

2. Kreuzreaktionen: Bei der Immunelektrophorese von Antiserum gegen Homogenisat mit dem Inhalt-Antigen und umgekehrt ergaben sich die gleichen Bilder. Jedoch war das Elektrophoresediagramm bei der Verwendung von Serum gegen den Inhalt auf der Kathodenseite nicht so deutlich ausgeprägt.

3. Erhitzte Antigene: Ferner sollte der Frage nach der Thermostabilität der einzelnen Fraktionen nachgegangen werden. Zu diesem Zweck wurde das Zellmaterial auf 60°C erhitzt und anschließend in der Immunoelktrophorese mit dem Verhalten der unerhitzten und den auf 100°C erhitzten Antigene verglichen. Waren die Antigensuspensionen nur einmal eine Stunde auf 60°C erhitzt worden, so zeigte sich weder auf der Anoden-, noch auf der Kathodenseite ein Unterschied zu den unerhitzten Antigenen. Eine Ausnahme bildeten auch hier wiederum die Zellwände. Während die nicht erhitzten Zellen keinerlei elektrophoretische Auftrennung zeigten, wies das auf 60°C erhitzte Antigen eine deutliche, zur Kathode gerichtete Präzipitationslinie auf (Abbildung 10). Wurden hingegen das Homogenisat und der Zellinhalt 2- bis 3-mal auf 60°C erwärmt, so kam die schnellste der zur Anode wandernden Substanzgruppen nicht mehr zur Darstellung (Abbildung 11). Bei der Prüfung mit dem auf 100°C erhitzten Antigen waren keine Linien auf der Anodenseite mehr nachzuweisen. Die auf der Kathodenseite gelegenen Präzipitationslinien erwiesen sich mit denen des nichterhitzten Zellhomogenisats und -inhalts und denen der auf 60°C erhitzten Zellsuspensionen als identisch (Abbildungen 12 und 13).

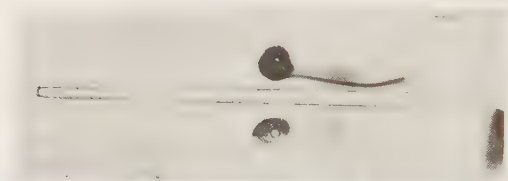


Abb. 10: Immunoelktrophorese von *C. Krusei*:
oben: auf 60°C erhitzte Zellwände.
unten: nicht erhitzte Zellwände.

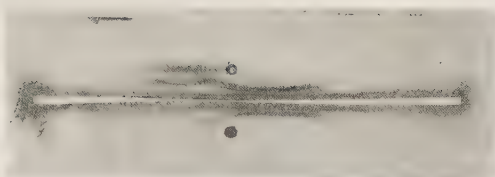


Abb. 11: Immunelektrophorese von C. Krusei:
oben: Inhalt nicht erhitzt.
unten: Inhalt einmal auf 60 ° C erhitzt.

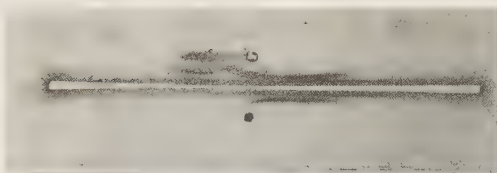


Abb. 12: Immunelektrophorese von C. Krusei:
oben: Inhalt nicht erhitzt.
unten: Inhalt auf 100 ° C erhitzt.

Die Immunelektrophorese mit dem Antiserum gegen die erhitzten Zellwände ergab sowohl mit dem Homogenisat als auch mit dem Zellinhalt zwei Präzipitationslinien, die zur Kathode gerichtet waren.

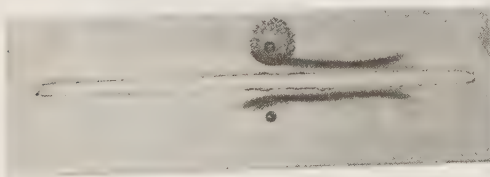


Abb. 13: Immunelektrophorese von C. Krusei:
Homogenisat mit Antiserum gegen erhitzte Zellwände.

4. Wässrige Phasen: Wie nach der Agarelektrophorese anzunehmen war, ergab die Immunelektrophorese mit den wässrigen Phasen deutliche Präzipitationslinien. Entsprechend den drei Fraktionen der Agarelektrophorese konnten auch bei der Prüfung von Inhaltextrakt gegen Homogenisatserum drei in Kathodenrichtung gelegene Präzipitationslinien nachgewiesen werden. Die wässrigen Phasen der Zellwände ergaben eine auf der Seite des Minuspols und eine am Auftragspunkt gelegene Linie. Die Immunelektrophorese mit den erhitzten Zellwänden gegen das homologe Serum hatte das gleiche Bild ergeben (Abbildungen 14 und 15).



Abb. 14: Immunelektrophorese von C. Krusei:
Zellinhalt (wässrige Phase, Wärmeextraktion)
mit Serum gegen das Homogenisat.

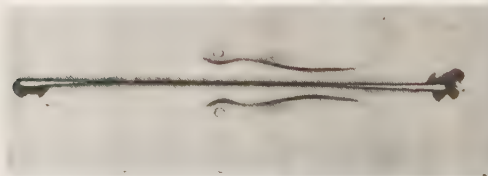


Abb. 15: Immunelektrophorese von C. Krusei:
Zellwände (wässrige Phase, Wärmeextraktion)
mit Serum gegen das Homogenisat.

5. Immunoelektrophorese mit C. albicans und C. tropicalis: Viele Autoren wie MARTIN (12, 13), PECK (15), STONE und GARROD (10), ALMON und STOVALL (11), SALVIN (14), JONSEN (18), TSUCHIYA (21, 22) sowie POSPISIL (17) haben Antigengemeinschaften von C. Krusei mit C. albicans und C. tropicalis festgestellt. Bei den vorliegenden Versuchen wurden deshalb die Homogenisate von C. albicans und C. tropicalis mit den Seren gegen erhitztes und nicht erhitztes Homogenisat von C. Krusei gekreuzt. Umgekehrt wurden Reaktionen zwischen den Immunseren gegen erhitztes und nicht erhitztes Zellhomogenisat von C. albicans sowie dem Homogenisat von C. Krusei durchgeführt. Es zeigte sich, daß C. albicans und C. tropicalis jeweils in gleicher Weise mit den C.-Krusei-Seren reagierten. Es traten stets zwei zur Kathode gerichtete Präzipitationslinien auf (Abbildungen 16 und 17). Auf der Anodenseite erschienen keine Präzipitate. Bei der Immunoelektrophorese mit C.-albicans-Serum gegen C.-Krusei-Homogenisat wies das Diagramm ebenfalls zwei Linien auf der Kathodenseite auf.

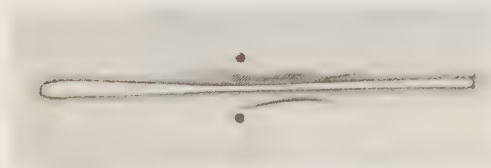


Abb. 16: Immunoelektrophorese von C.-Krusei-Serum gegen Zellhomogenisat mit:
oben: C.-Krusei-Homogenisat.
unten: C.-albicans-Homogenisat.

6. Immunoelektrophorese mit absorbierten Seren: Das, wie früher beschrieben, mit erhitzten Krusei-Zellen absorbierte Serum wurde in der Immunoelektrophorese sowohl mit nicht erhitztem als auch mit erhitztem Homogenisat geprüft. Wie zu erwarten, ließen sich nach Absorption mit dem erhitzten Homogenisat keine Präzipitationslinien mehr nachweisen. Mit dem nicht erhitzten traten außer

den zur Anode wandernden Linien noch eine am Auftragspunkt auf, deren größerer Schenkel zur Kathode lag. Diese Linie war nicht nachweisbar, wenn das Krusei-Serum vorher mit nicht erhitzten Zellen absorbiert wurde (Abbildung 18).

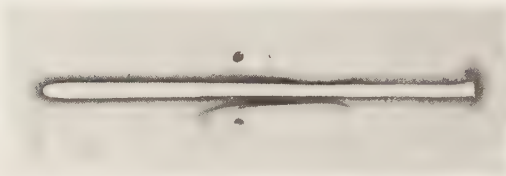


Abb. 17: Immunelektrophorese von C.-Krusei-Serum gegen Zellhomogenisat mit:
oben: C.-albicans-Homogenisat.
unten: C.-tropicalis-Homogenisat.

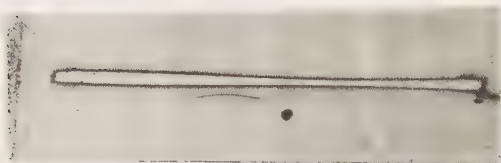


Abb. 18: Immunelektrophorese von Serum gegen Homogenisat von C. Krusei nach Absorption mit erhitzten C.-Krusei-Zellen:
oben: erhitztes Vollantigen(Zellhomogenisat).
unten: nicht erhitztes Vollantigen.(" ").

7. Immunelektrophorese mit den Kochrückständen aus C. Krusei und C. albicans: Bei 3-stündigem Erhitzen der Zellen von C. albicans und C. Krusei lösten sich, wie die Agarelektrophorese zeigte, Substanzen, die sich durch Alkohol fällen ließ. Es sollte geprüft werden, ob diese Substanzen serologisch aktiv sind.

Wie aus der Abbildung 19 hervorgeht, handelt es sich um 2 serologisch aktive Fraktionen, die zur Kathode wandern. Es scheinen sich aus beiden Hefen die gleichen Antigene bzw. Haptene durch Kochen herauslösen zu lassen.



Abb. 19: Immunelektrophorese von Serum gegen C.-Krusei-Homogenisat mit:
oben: Kochextrakt von C. Krusei.
unten: Kochextrakt von C. albicans.

D. Besprechung

=====

Im Widerspruch zu den Ergebnissen von STONE und GARROD (10) sowie POLEMANN (8), jedoch übereinstimmend mit TSUCHIYA (21), POSPISIL (17), KEMP und SOLOTOROVSKY (31) sowie BIGUET (25), konnte durch die vorliegenden Untersuchungen gezeigt werden, daß Antigengemeinschaften zwischen *C. Krusei* sowie *C. albicans* und *C. tropicalis* bestehen. In der Komplementbindungsreaktion ergaben die Kreuzreaktionen zwischen *C.-Krusei*-Seren und den wässrigen Phasen der Phenolextraktion von *C. albicans* und *C. tropicalis* einen relativ niedrigen Titer. Der höchste Wert lag bei einer Serumverdünnung von 1 : 20. Er wurde mit den bei der Wärmeextraktion von *C. albicans* gewonnenen Antigenen und dem Antiserum gegen die erhitzten Zellwände von *C. Krusei* erzielt. Mit den Antiseren von *C. albicans* und *C. tropicalis* ergab das *C.-Krusei*-Antigen ebenfalls nur geringe Titer. Wie nach den Ergebnissen der Komplementbindungsreaktion zu erwarten war, reagierten *C. albicans* und *C. tropicalis* auch in der Immunoelektrophorese völlig gleichartig mit *C.-Krusei*-Seren. Bei beiden Hefen konnten zwei übereinstimmende Polysaccharidlinien nachgewiesen werden. Das Elektrophoresediagramm von *C. Krusei* mit dem Serum gegen *C.-albicans*-Homogenisat wies ebenfalls zwei Polysaccharidlinien auf. Dieses Ergebnis stimmt weitgehend mit den Untersuchungen von BIGUET (25) überein, der sowohl bei der Verwendung von *C.-albicans*-Serum gegen *C.-Krusei*-Antigen als auch umgekehrt von *C.-Krusei*-Serum gegen *C.-albicans*-Antigen zwei zur Kathode gerichtete Präzipitationslinien beschreibt. Dagegen fand er bei *C. tropicalis* nur ein einziges gemeinsames Antigen mit *C. Krusei*. TSUCHIYA (23), POSPISIL (17) sowie KEMP und SOLOTOROVSKY (31) geben drei gemeinsame Antigenfaktoren an. Sie untersuchten die Antigengemeinschaften mit Hilfe der Komplementbindungs-, Agglutinations- und Präzipitationsreaktion. ALMON und STOVALL (11) beschreiben positive Kreuzreaktionen zwischen *C. albicans*, *C. tropicalis* und *C. Krusei* aufgrund der Agglutinationsreaktion, ohne jedoch die Zahl gemeinsamer Antigene anzugeben. JONSEN (18) erhielt positive Ergebnisse mit der Agglutinationsreaktion und

der Präzipitationsreaktion und vermutet deshalb ebenfalls Antigengemeinschaften. BENHAM (3) konnte in der Agglutinationsreaktion mit Seren gegen *C. albicans* positive Kreuzreaktionen erzielen, umgekehrt mit Seren gegen *C. Krusei* dagegen nicht. STONE und GARROD (10) und auch POLEMANN (8) lehnen aufgrund negativer Kreuzreaktionen bei Agglutinationsversuchen Antigengemeinschaften zwischen den drei Hefearten ab.

Nach SEELIGER (20) sind die serologischen Untersuchungsverfahren in der Mykologie sehr umstritten. Dies gilt besonders, wenn nur eine einzige Methode angewendet wird. Wegen der zu geringen Spezifität vieler Hefearten sollte seiner Meinung nach z. B. die Komplementbindungsreaktion in diagnostischer Hinsicht nur bei sehr hohem Antikörpertiter bewertet werden. Die vorliegenden Untersuchungen weisen darauf hin, daß allein die verschiedene Art der Antigenbereitung zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann. Während BIGUET (25) die Hefezellen zuerst lyophilisiert und anschließend mit Glasstaub homogenisiert hat, wurden sie bei TSUCHIYA (21) 150 Min. auf 100 ° C erhitzt. Die von uns durchgeführte Prüfung des mit Alkohol gefällten Überstandes der erhitzten Zellen in der Immunoelktrophorese hat ergeben, daß beim Kochen serologisch aktive Substanzen herausgelöst wurden. Deshalb muß damit gerechnet werden, daß die von TSUCHIYA mit intakten Zellen vorgenommenen Absorptionsversuche einen Teil der Antigene nicht erfaßt haben. Die Immunoelktrophorese ergibt hier eindeutigere Ergebnisse.

Die Thermolabilität eines der Antigene von *C. Krusei*, die TSUCHIYA (21) und POSPISIL (17) durch Absorptionsversuche mit erhitzten Zellen nachgewiesen haben, konnte von uns bestätigt werden. Bereits der Titerunterschied in der Komplementbindungsreaktion bei Verwendung nicht erhitzter oder erhitzter Fraktionen gegen Seren, die durch Immunisierung mit nicht erhitzten Antigenen gewonnen waren, deutete auf einen thermolabilen Anteil hin. Die Absorptionsversuche mit erhitzten Zellen bestätigten diese Vermutung. Mit Hilfe der Immunoelktrophorese konnte nachgewiesen werden, daß ein thermolabiles Polysaccharidantigen vorliegt, das sowohl im Zellinhalt als auch in den Zellwänden vorkommt.

TSUCHIYA (21) und POSPISIL (17) halten dieses thermolabile Antigen für artspezifisch. Aufgrund ihrer Methoden konnten sie es aber nicht in der Zelle lokalisieren. KEMP und SOLOTOROVSKY (31) wiesen im Zellinhalt von *C. Krusei*, *C. parakrusei* und *C. pseudotropicalis* thermolabile Antigene nach.

Analog zu den Untersuchungen von MÜLLER und HIRSCH (27) mit der Agarelektrophorese an *C. albicans* und *C. tropicalis* wurden auch bei *C. Krusei* zur Kathode wandernde Polysaccharide bzw. Glykoproteine und zur Anode wandernde Eiweißstoffe nachgewiesen. Nach BRUNNER (32) bestehen die Eiweißsubstanzen, die von uns nur im Zellinhalt gefunden wurden, wohl hauptsächlich aus Zymocasein, welches als Phosphoprotein einen Hauptbestandteil des Hefeprotoplasmas ausmacht.

Die Immunoelktrophorese hat auch bei *C. Krusei* ergeben, daß alle in der Agarelektrophorese gefundenen Fraktionen antigenen Charakter haben, und zwar auch die Eiweißfraktionen. Diese Feststellung steht im Widerspruch zu den Angaben zahlreicher Autoren, welche die Polysaccharide als alleinige Träger der Antigenkomponenten der Hefen ansehen, z. B. JONSEN (18) sowie ELINOV und ZAIKINA (33), welche die spezifischen Polysaccharide durch Beta-Naphtol-Extraktion gewannen, oder AKIBA und Mitarbeiter (34), welche die Polysaccharide mit Phenol extrahierten. Lediglich BIGUET (25) konnte mit Hilfe der Immunoelktrophorese den Antigencharakter der Eiweißfraktionen bei verschiedenen Hefen nachweisen, ohne sie jedoch in der Zelle zu lokalisieren.

Unsere Resultate weisen ferner darauf hin, daß ein Teil der Eiweißantigene thermolabil ist. Die Zellwandantigene von *C. Krusei* zeigten im Vergleich mit den von SIEGERT, MÜLLER und PACHALY (26) an *C. albicans* und *C. tropicalis* durchgeführten Untersuchungen eine höhere Löslichkeit. So wurde in der Komplementbindungsreaktion mit frisch bereiteter Zellwandsuspension ein niedrigerer Titer erreicht, als mit einer Suspension, die drei bis vier Wochen gelagert hatte. Einige serologisch aktive Substanzen sind wahrscheinlich in dieser Zeit aus der Zellwand in die umgebende physiologische Kochsalzlösung diffundiert. Für die leichtere Löslichkeit spricht auch, daß die Zellwände von *C. Krusei* bei Erwärmung auf 60 ° C elektrophoretisch

wandernde Stoffe abgeben. Dies ist bei *C. albicans* nicht der Fall. Dadurch erklärt sich, warum die wässrige Phase des Phenol-Wasser-Extraktes von Zellinhalt und Zellwänden von *C. Krusei* keine so deutlich überlegene Antigenwirkung im Vergleich zu der unbehandelten Fraktion besitzt wie bei *C. albicans* und *C. tropicalis*.

E. Zusammenfassung

=====

In der vorliegenden Arbeit wurde der Antigenaufbau von *C. Krusei* an tierischen Immunseren mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion, Absorptionstechnik sowie der Agar- und Immunoelktrophorese analysiert. Die Untersuchungen betrafen Zellhomogenisat sowie isolierte Zellwände und Zellinhalt. Mit der Agar- und Immunoelktrophorese konnte festgestellt werden, daß die Antigene des Zellinhalts zwei Substanzgruppen - Proteine und Glykoproteine - angehören. In den Zellwänden sind dagegen nur Polysaccharid- bzw. Glykoproteinantigene lokalisiert. Das von TSUCHIYA (21) nachgewiesene thermolabile Polysaccharidantigen befand sich sowohl im Zellinhalt als auch in den Zellwänden. Zusätzlich wurde die Thermolabilität einiger Eiweißantigene gesichert. Die umstrittene Existenz von Antigengemeinschaften zwischen *C. Krusei* sowie *C. albicans* und *C. tropicalis* konnte durch Kreuzreaktionen mit Hilfe der Komplementbindungsreaktion und der Immunoelktrophorese bewiesen werden. *C. Krusei* hat mindestens zwei Polysaccharid- bzw. Glykoproteinantigene mit *C. albicans* und *C. tropicalis* gemeinsam. Unter den Eiweißantigenen konnten keine Antigengemeinschaften festgestellt werden.

Die Diskrepanz zwischen den Untersuchungsergebnissen verschiedener Autoren kann nicht auf methodische Gründe zurückgeführt werden. Bei unseren Untersuchungen zeigten die angewendeten Methoden gleichsinnige Ergebnisse, doch erwies sich die Immunoelktrophorese am empfindlichsten und am geeignetsten zum Nachweis chemisch unterschiedlicher Antigene.

F. Literatur

=====

1. DROUHET, E. et VIEU, M.: Biologie des infections a Candida, dans "Mycologie Medicale", Communications et rapports, présenté aux Journées de Mycologie Medicale 14/15 dec. 1956 par l'Institut Pasteur et société française d.M.M., 115-149.
2. JONES, C.P. and CARTER, B.: Mycotic vulvovaginitis and the vaginal fungi.
Am. J. Obst. and Gynec. 54 (1947), 738 - 747.
3. BENHAM, R.W.: Certain Monilias parasitic on man.
J. Inf. Dis. 49 (1931), 183 - 215.
4. KLIGMANN, A.M. and DELAMATER, E.D.: The immunology of human mycoses.
Ann. Rev. Microbiol. 4 (1950), 283 - 312.
5. FISCHER, E.: Die zahlenmäßige Häufigkeit der verschiedenen Hefen im mykologischen Untersuchungsmaterial.
Schweiz. Z. Path. (1955), 1 - 7.
6. STAIB, F. und ATA, S.: Die Bedeutung der Kammhefe Candida Krusei (A. Castellani) - Berkhout beim Menschen.
Zbl. Bakt. I. Orig. 169 (1957), 275 - 287.
7. SCHABINSKI, G.: Grundriß der Medizinischen Mykologie.
VEB Gustav-Fischer-Verlag, Jena, 1960.
8. POLEMANN, G.: Klinik und Therapie der Pilzkrankheiten.
Thieme-Verlag, Stuttgart, 1961.
9. MIZUNO, S.: Vulvovaginal Candidiasis in "Studies on Candidiasis in Japan", Research Committee of Candidiasis, Education Ministry of Japan, 1961, 19 - 22.
10. STONE, K. and GARROD, C.P.: The classification of Monilias by serological methods.
J. Path. Bact. 34 (1931), 429 - 436.

11. ALMON, L. and STOVALL, W.D.: Serologic reactions of cultures of *Monilia* and other yeastlike fungi.
J. Inf. Dis. 49 (1931), 183 - 215.
12. MARTIN, D.S., JONES, C.P., YAO, K.F. and LEE, L.E.:
A practical classification of the *Monilias*.
J. Bact. 34 (1937), 99 - 123.
13. MARTIN, D.S.: Studies on the immunologic relationships among various species of the *Candida* (*Monilia*).
Amer. J. Trop. Med. 22 (1942), 295 - 307.
14. SALVIN, S.B.: Quantitative studies on the serologic relationships of fungi.
J. Immunol. 65 (1950), 617 - 626.
15. PECK, S.M., BERGAMINI, R., KELCEC, L.C. and REIN, C.R.:
The serodiagnosis of *Monilia*.
J. Invest. Dermat. 25 (1955), 301 - 310.
16. POSPISIL, L.: Zur Serologie der mykotischen Erkrankungen.
Zbl. Bakt. I. Orig. 163 (1955), 407 - 409.
17. POSPISIL, L.: Agglutinations-, Komplementbindungs- und Hämagglutinationsreaktion bei der Bestimmung der *Candida*-Arten.
Dermatologica 118 (1959), 65 - 73.
18. JONSEN, J.: Serologic studies in Genus *Candida*.
Thesis Oslo 1955.
19. SEELIGER, H.P.R.: Mykologische Serodagnostik.
Johann-Ambrosius-Barth-Verlag, Leipzig, 1958.
20. SEELIGER, H.P.R.: Serodagnostik der Pilze und mykotischen Infektionen.
Zbl. Bakt. I. Orig. 184 (1962), 194 - 197.
21. TSUCHIYA, F., MIYASAKI, F. and FUKAZAWA, Y.: Studies on the classification of the Genus *Candida* II.
Jap. J. Exp. Med. 25 (1955), 15 - 21.

22. TSUCHIYA, F., FUKAZAWA, Y., MIYASAKI, F. and KAWAKITA, S.:
Studies on the classification of the Genus *Candida* III
(thermostable and thermolabile antigens of the seven
species of the genus *Candida*).
Jap. J. Exp. Med. 25 (1955), 75 - 83.
23. TSUCHIYA, F., FUKAZAWA, Y. and KAWAKITA, S.: Serological
classification of the genus *Candida*.
Studies on Candidiasis in Japan - Research Committee of
Candidiasis, Education Ministry of Japan, 1961, 34 - 46.
24. BIGUET, J., HAVEZ, R., TRANVANKY, D. et DEGAEY, R.:
Étude électrophorétique, chromatographique et immunolo-
gogique des antigènes de *Candida albicans*.
Ann. Inst. Pasteur 100 (1961), 13 - 24.
25. BIGUET, J., TRANVANKY, D. et ANDRIEU, S.: Étude électro-
phorétique et immunochimique comparée des antigènes de
Quelques levures du genre *Candida*.
Mycopathologia 17 (1962), 239 - 254.
26. SIEGERT, R., MÜLLER, H.L. und PACHALY, D.: Zur Antigen-
struktur von *Candida albicans* und *Candida tropicalis*.
1. Mitteilung: Antigene Eigenschaften von Zellmembran und
Zellinhalt.
Zbl. Bakt. I. Orig. 191 (1964), 533 - 542.
27. MÜLLER, H.L. und HIRSCH, M.: Zur Antigenstruktur von
Candida albicans und *Candida tropicalis*.
4. Mitteilung: Agar- und immunoelktrophoretische Studien
an Zellmembran und Zellinhalt.
Zbl. Bakt. I. Orig. (im Druck)
28. WESTPHAL, O., LÜDERITZ, O. und BISTER, F.: Über die Ex-
traktion von Bakterien mit Phenol/Wasser.
Z. Naturforsch. 76 (1952), 148 - 155.
29. SOBER, H.A. and PETERSON, E.A.: Protein chromatographie
on ion exchange cellulose.
Fed. Proc. 17 (1958), 1116 - 1126.

30. SCHEIDEGGER, J.J.: Une micro-methode de l'immunoélectrophorèse.
Internat. Arch. Allergy 7 (1955), 103 - 110.
31. KEMP, G. and SOLOTOROVSKY, M.: Localization of antigens in mechanically disrupted cells of certain species of the genera *Candida* and *Torulopsis*.
J. Immunol. 93 (1964), 305 - 314.
32. BRUNNER, R.: Die Hefen in der Wissenschaft.
Verlag Hans Carl, Nürnberg, 1960.
33. ELINOV, N.P. und ZAIKINA, N.A.: Präzipitationsreaktion bei der serologischen Diagnose der Moniliasis.
Z. microbiol. 30 (1959), 40 - 45.
34. AKIBA, T., IWATA, K. and JNOUE, S.: Studies on the serologie diagnosis of Candidiasis. - Studies on Candidiasis in Japan-Research Committee of Candidiasis, Education Ministry of Japan, 1961, 65 - 77.

Meine akademischen Lehrer waren:

in Frankfurt am Main: die Damen und Herren Professoren und Dozenten Dr. Artelt, Czerny, Frick, Giersberg, Greven, Halbsguth, Heinz, Kramp, Kuhlenkampff, Kummer, Müser, Ortmann, Roka, Royen, Ried, Schmidt-Neuroth, Schneider, Starck, Wezler, Wieland und Zahn.

in Marburg an der Lahn: die Herren Professoren und Dozenten Dr. Behrendes, Braun-Falco, Dittrich, Dölle, Exner, Franke, Gedigk, Hamm, Hartmann, Heuser, Hildebrandt, Huber, Jacob, Martini, Marx, Maurath, Lang, Löhr, Lübbers, Knauff, du Mesnil de Rochemont, Schleyer, Schmid, Schölmerich, Schrappe, Schwaiger, Siegert, Siess, Straub, Streicher und Würterle.

Herrn Professor Dr. med. R. Siegert, Direktor des Hygiene-Instituts der Universität Marburg/Lahn, danke ich für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes sowie für die Förderung der Arbeit.

Frau Dr. med. H.-L. Müller gilt mein herzlicher Dank für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente sowie für die persönliche Betreuung und Beratung bei der Anfertigung der Arbeit.

Lebenslauf

Am 2. Juni 1940 wurde ich, Heinke Dupont, geb. Feller, als zweite Tochter des Bundesbahnoberamtmannes Hans Feller und seiner Ehefrau Anneliese, geb. Wolf, in Frankfurt am Main geboren. Am 3. März 1960 legte ich dort in der Elisabethenschule, Gymnasium für Mädchen, die Reifeprüfung ab und immatrikulierte mich zum Sommersemester an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität in Frankfurt. Nach dem Wintersemester 1961 bestand ich dort das Vorphysikum und nach dem Sommersemester 1962 das Physikum.

Die sechs klinischen Semester verbrachte ich an der Philipps-Universität Marburg/Lahn. Das Studium beendete ich am 17. Februar 1966 mit dem medizinischen Staatsexamen. Danach heiratete ich den Medizinalassistenten Wolfgang Dupont aus Küstrin.

